



Attorney Docket No.: **04853.0108**
Customer Number 22,852

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Yoshihide MATSUO

Serial No.: **10/767,260**

Filed: **January 30, 2004**

For: **NOVEL CHEMICAL SUBSTANCE
HAVING MORPHOGENETIC AND
GROWTH-ACCELERATING ACTIVITIES**

)
)
) **Group Art Unit: 1651**
)
) **Examiner: Not Yet Assigned**
)
)
)
)
)
)

**Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450**

Sir:

CLAIM FOR PRIORITY

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, applicant hereby claims the benefit of the filing date of Japanese Patent Application No. 2002-203608, filed July 12, 2002, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

**FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.**

Dated: June 10, 2004

By: 

**Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961**

**EFC/FPD/sci
Enclosures**

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 1 2 日
Date of Application:

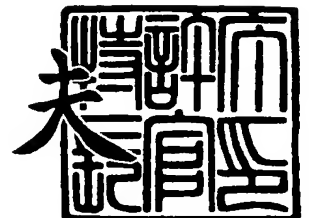
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 0 3 6 0 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 0 3 6 0 8]

出 願 人 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 3 3 7 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0440

【提出日】 平成14年 7月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07G 17/00

【発明の名称】 形態形成及び成長促進活性を有する新規化学物質

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県清水市袖師町 1 9 0 0 番 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 清水研究所内

【氏名】 松尾 嘉英

【特許出願人】

【識別番号】 591001949

【氏名又は名称】 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【その他】

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 3 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究、産業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 形態形成及び成長促進活性を有する新規化学物質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の理化学的性質：

1. 物質の色：無色

2. 分子量：457

3. 分子式： $C_{24}H_{31}N_3O_4S$

質量分析：FABMS： m/z 456 $[M-H]^-$ (図 1)

高分解能質量分析：実測値 456.1960 $[M-H]^-$

計算値 456.1930 ($C_{24}H_{30}N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1) 1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、750 MHz) : (図 2)

δ ppm 0.818 (3H, s), 0.837 (3H, s), 0.882 (3H, s), 0.960 (1H, m), 1.058 (1H, m), 1.167 (1H, m), 1.326 (3H, s), 1.37 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.61 (2H, m), 1.52 (1H, br d, $J = 13$ Hz), 1.76 (1H, br d, $J = 14$ Hz), 2.024 (1H, m), 2.181 (1H, dd, $J = 4, 14$ Hz), 2.291 (1H, dd, $J = 14, 16.5$ Hz), 7.698 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.845 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)

2) ^{13}C -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、125 MHz) : (図 3)

δ ppm 15.236 (q), 19.037 (t), 20.287 (t), 20.955 (q), 21.835 (q), 25.987 (t), 33.381 (s), 33.636 (q), 37.308 (s), 39.590 (t), 41.199 (t), 42.346 (t), 52.769 (d), 56.381 (d), 79.096 (s), 114.965 (s), 124.399 (d), 139.004 (s), 141.232 (d), 143.775 (s), 150.282 (s), 152.656 (s), 172.081 (s), 173.538 (s), 174.661 (s)

を有する新規化学物質 1。

【請求項 2】 下記の理化学的性質：

1. 物質の色：無色

2. 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、500 MHz) : (図 4)

δ ppm 0.815 (3H, s), 0.834 (3H, s), 0.877 (3H, s), 0.949 (1H, m), 1.048 (1H, m), 1.163 (1H, m), 1.297 (3H, s), 1.35 - 1.40 (3H, m), 1.52 - 1.63 (4H, m), 1.753 (1H, br d, $J = 14$ Hz), 2.012 (1H, m), 2.158 (1H, m), 2.299 (1H, m), 7.646 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.769 (1H, d, $J = 8.0$ Hz) を有する新規化学物質 2。

【請求項 3】 フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、ゾベリア (Zobellia) 属又はテナシバキュラム (Tenacibaculum) 属に属し、請求項 1 記載の新規化学物質 1 又は請求項 2 記載の新規化学物質 2 を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に新規化学物質 1 又は 2 を生成蓄積させ、該生成蓄積した新規化学物質 1 又は 2 を採取することを特徴とする新規化学物質 1 又は 2 の製造法。

【請求項 4】 フラボバクテリウム属に属する微生物が、フラボバクテリウム・スピーシーズ YM-2-23 (FERM P-18478) である請求項 3 記載の製造法。

【請求項 5】 請求項 1 記載の新規化学物質 1 又は請求項 2 記載の新規化学物質 2 を有効成分として含有する藻類培養用合成培地。

【請求項 6】 請求項 1 記載の新規化学物質 1 をトリメチルシリルジアゾメタンで処理することにより得られる該新規化学物質 1 のモノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体。

【請求項 7】 請求項 6 記載のトリメチル化体を水素化ホウ素ナトリウムで処理することにより得られる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物が生産する新規ビタミン様作用物質ならびにその製造法及び用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

これまでアオサ、ヒトエグサ等の大型緑藻類の既存の合成培地を用いた室内培養では、純化するに従いカルス状又は単細胞状に藻体が崩れる現象がみられるこ

とが知られている (L. Provasoli; Ulva. Biol. Bull., 1958, 114, 375.: M. Tatewaki, L. Provasoli and I. J. Pintner; J. Phycol., 1983, 19, 409.)。また、このように形態を失った藻体に生海水や土壌抽出液、紅藻抽出液、褐藻抽出液、又はある種の海洋由来の微生物培養液を添加すると、葉状体回復や成長速度の増大が起こることが知られている (M. Tatewaki, L. Provasoli and I. J. Pintner; J. Phycol., 1983, 19, 409.) が、それらの抽出液の有効成分、ビタミン様作用物質は見いだされていない。そのため、室内におけるアオサ、ヒトエグサ等の大型緑藻類の無菌培養細胞を用いた長期的な生理・生態研究、培養保存が困難であった。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】

海洋性大型緑藻類をすべての成分が既知である合成培地のみを使って無菌的に長期間培養することができれば、対象藻類の生理・生態研究のほかに養殖種である食用ヒトエグサ類の種苗生産や維持・管理、緑藻類の種の保存など実用的な培養手法として確立することができる。すでに本発明者はこのような観点から海洋性大型緑藻類の形態形成、成長促進を誘引する微生物を見出している (特願2001-396342)。しかし、その微生物が生産する有効成分、ビタミン様作用物質は未知のままであった。

本発明はこのような新規ビタミン様作用物質を提供することを目的とする。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、かかる事情を鑑み、新規な有効成分の探索を行い、その結果フラボバクテリウム・スピーシーズYM-2-23 (FERM P-18478) の培養液から極めて強い活性を有する活性物質を単離し、またその化合物が新規物質であることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 5 】

すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 下記の理化学的性質：

1. 物質の色：無色

2. 分子量：457

3. 分子式： $C_{24}H_{31}N_3O_4S$

質量分析：FABMS： m/z 456 $[M-H]^-$ (図 1)

高分解能質量分析：実測値 456.1960 $[M-H]^-$

計算値 456.1930 ($C_{24}H_{30}N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1) 1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、750 MHz) : (図 2)

δ ppm 0.818 (3H, s), 0.837 (3H, s), 0.882 (3H, s), 0.960 (1H, m), 1.058 (1H, m), 1.167 (1H, m), 1.326 (3H, s), 1.37 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.61 (2H, m), 1.52 (1H, br d, $J = 13$ Hz), 1.76 (1H, br d, $J = 14$ Hz), 2.024 (1H, m), 2.181 (1H, dd, $J = 4, 14$ Hz), 2.291 (1H, dd, $J = 14, 16.5$ Hz), 7.698 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.845 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)

2) ^{13}C -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、125 MHz) : (図 3)

δ ppm 15.236 (q), 19.037 (t), 20.287 (t), 20.955 (q), 21.835 (q), 25.987 (t), 33.381 (s), 33.636 (q), 37.308 (s), 39.590 (t), 41.199 (t), 42.346 (t), 52.769 (d), 56.381 (d), 79.096 (s), 114.965 (s), 124.399 (d), 139.004 (s), 141.232 (d), 143.775 (s), 150.282 (s), 152.656 (s), 172.081 (s), 173.538 (s), 174.661 (s)

を有する新規化学物質 1。

【 0 0 0 6 】

(2) 下記の理化学的性質：

1. 物質の色：無色

2. 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、500 MHz) : (図 4)

δ ppm 0.815 (3H, s), 0.834 (3H, s), 0.877 (3H, s), 0.949 (1H, m), 1.048 (1H, m), 1.163 (1H, m), 1.297 (3H, s), 1.35 - 1.40 (3H, m), 1.52 - 1.63 (4H, m), 1.753 (1H, br d, $J = 14$ Hz), 2.012 (1H, m), 2.158 (1H, m), 2.299 (1H, m), 7.646 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.769 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

を有する新規化学物質 2。

【0007】

(3) フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、ゾベリア (Zobellia) 属又はテナシバキュラム (Tenacibaculum) 属に属し、前記 (1) に記載の新規化学物質 1 又は前記 (2) に記載の新規化学物質 2 を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に新規化学物質 1 又は 2 を生成蓄積させ、該生成蓄積した新規化学物質 1 又は 2 を採取することを特徴とする新規化学物質 1 又は 2 の製造法。

【0008】

(4) フラボバクテリウム属に属する微生物が、フラボバクテリウム・スピーシーズ YM-2-23 (FERM P-18478) である前記 (3) に記載の製造法。

(5) 前記 (1) に記載の新規化学物質 1 又は前記 (2) に記載の新規化学物質 2 を有効成分として含有する藻類培養用合成培地。

(6) 前記 (1) に記載の新規化学物質 1 をトリメチルシリルジアゾメタンで処理することにより得られる該新規化学物質 1 のモノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体。

(7) 前記 (6) に記載のトリメチル化体を水素化ホウ素ナトリウムで処理することにより得られる化合物。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の新規化学物質 1 及び 2 は、微生物を用いて生産することが可能である。本発明の化学物質の製造に用いる微生物としては、フラボバクテリウム属、ゾベリア属又はテナシバキュラム属に属し、該化学物質の生産能を有する微生物であれば特に限定されず、例えば、フラボバクテリウム・スピーシーズ (Flavobacterium sp.) YM-2-23 (FERM P-18478)、テナシバキュラム・スピーシーズ (Tenacibaculum sp.) YM-1-69 (FERM P-18479) や、これらの菌株に由来する変異株を挙げることができる。YM-1-69 株や YM-2-23 株の代わりに、これらの菌株の類似菌株を使用してもよい。「YM-1-69 株の類似菌株」には、例えば、海洋性大型緑藻類に対し葉状体形成活性又は生長促進活性を示す菌株であって、配列番号 1 記

載の塩基配列と95%以上相同な塩基配列で表される16S rRNA V3領域遺伝子を持つ菌株や配列番号3記載の塩基配列と95%以上相同な塩基配列で表されるgyrB遺伝子を持つ菌株が含まれる。「YM-2-23株の類似菌株」には、例えば、海洋性大型緑藻類に対し葉状体形成活性又は生長促進活性を示す菌株であって、配列番号2記載の塩基配列と95%以上相同な塩基配列で表される16S rRNA V3領域遺伝子を持つ菌株や配列番号4記載の塩基配列と95%以上相同な塩基配列で表されるgyrB遺伝子を持つ菌株が含まれる。「YM-2-23株の類似菌株」としては、例えば *Zobellia uliginosa* ATCC 14397が挙げられる。16S rRNA V3領域遺伝子及び／又はgyrB遺伝子の塩基配列がYM-1-69株やYM-2-23株のそれと同一である菌株は、これらの類似菌株の中でも特に好ましい菌株である。

前記の微生物の培養に際しては、通常の海洋細菌の培養方法が一般に用いられる。培地としては資化可能な炭素源、窒素源、無機物などを程よく含有する培地であれば合成培地、天然培地のいずれでも使用可能である。

【0010】

炭素源としては、グルコース、澱粉、デキストリン、マンノース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などが単独又は組合せて用いられる。更に、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独又は組合せて用いられる。

【0011】

そのほか、必要に応じて塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸マグネシウム・8水塩、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類を加える。

更に、使用菌の生育や本発明の化学物質の生産を促進する微量成分（例えば糖類、アミノ酸、無機塩類など）を適当に添加することができる。

【0012】

培養法としては、液体培養が最も効率よく、培養温度は30℃程度が適当であり、培地のpHは、通常7~9、好ましくは7.5~8である。培地のpH調整には水酸化ナトリウム水溶液や塩酸などが用いられる。

液体培養で1~4日間培養を行うと、新規化学物質1又は2が培養液中及び菌体中に生成蓄積される。培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止することが好ましい。

【0013】

培養物から新規化学物質1又は2を単離精製するに際しては、微生物代謝産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行われる。例えば、培養物を濾過や遠心分離により培養濾液と菌体に分け、菌体を含水メタノール、含水アセトニトリルなどで抽出する。次いで、抽出液から有機溶媒をロータリーエバポレーター等で減圧除去し、この抽出液と培養濾液とをあわせてポリスチレン系吸着剤（例えばスチレンジビニルベンゼンポリマー）などに吸着させる。吸着した活性物質を水洗して脱塩し、含水メタノール、含水アセトニトリルなどで活性物質を溶出する。溶出液を凍結乾燥などで減圧濃縮し、スチレンジビニルベンゼン系ポリマー、陰イオン交換樹脂によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどにより、新規化学物質1又は2を得る。

【0014】

新規化学物質1を適当なメチル化剤（例えば、トリメチルシリルジアゾメタン）で処理することにより、新規化学物質1のモノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体を得ることができる。トリメチルシリルジアゾメタンの新規化学物質1に対するモル比を調節したり、反応条件の選択（例えば、反応温度やpHの設定、ジメチルアミノスルファートリフルオリド（DAST）の存在下で反応）により、モノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体を選択的に得ることができる。

【0015】

更に、前記トリメチル化体を水素化ホウ素ナトリウムで処理することにより、後述する理化学的性質を有するMe1H3を得ることができる。

本発明の新規化学物質 1 及び 2 は、藻類培養用合成培地の有効成分として有用である。新規化学物質 1 及び 2 は、単独で用いても、また両者を併用してもよい。

【0016】

前記藻類培養用合成培地の適用対象となる藻類としては、好ましくは海洋性大型緑藻類が挙げられる。海洋性大型緑藻類としては、アオサ (ULVALES) 目の海藻で、例えば、ヒトエグサ科 (Monostromataceae)、アオサ科 (Ulvaceae) などの緑藻を挙げることができる。具体的にはヒトエグサ科に属する海藻としてヒトエグサ属ヒトエグサ (Monostroma nitidum)、同属マキヒトエ (Monostroma oxyspermum)、同属エゾヒトエグサ (Monostroma angicava)、アオサ科に属する海藻としてアオノリ属ヒラアオノリ (Enteromorpha compressa)、同属ボウアオノリ (Enteromorpha intestinalis)、同属ウスバアオノリ (Enteromorpha linza)、アオサ属ボタンアオサ (Ulva conglobata)、同属アナアオサ (Ulva pertusa) などを例示することができる。

【0017】

海洋性大型緑藻類の培養に使用する培地は、有効成分である新規化学物質 1 及び／又は 2 を含むこと以外は、従来の培養方法（海洋性大型緑藻類が単細胞化してしまう培養方法）で使用されていたものと同様でよく、例えば、ASP7培地、PE S培地、PESI培地など、又は単に滅菌済みの海水を使用することができる。培地中における新規化学物質 1 及び／又は 2 の有効濃度は、葉状体形成誘導を発揮できる範囲内であれば特に限定されないが、 10^{-12} ～ 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ とするのが好ましい。

培養時の温度は、海洋性大型緑藻類が生存できる範囲内であれば特に制限はないが、15～25℃程度が適当である。

【0018】

【実施例】

以下に本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

〔参考例 1〕微生物の単離

本発明に使用する菌株は以下のように単離した。採集した新鮮藻体約1グラムに滅菌済みの海水10ミリリットルを添加し、1分程度激しくボルテックスした。上清を滅菌済み海水で更に10倍、100倍希釈し、そのうち100マイクロリットルを1/10マリンアガープレートに分注し、滅菌済みのコンラージ棒でプレート全体に塗り広げた。室温で2～3日後に成長した黄～赤色のコロニーをそれぞれ別のマリンアガープレートに植菌し、単菌化されるまで植菌を続けた。24穴あるいは48穴のマイクロプレートに2ないし1ミリリットルのASP7培地を分注し、それぞれのウェルに単細胞化したマキヒトエを20細胞程度添加した。これに単菌化した各分離株のコロニーを滅菌済みの白金耳などを使って2穴ずつ直接接種した。このプレートを19～22℃、明期14時間/暗期10時間で5日間培養し、マキヒトエの葉状体形成を倒立顕微鏡下で確認した。葉状体の形成がみられた菌株については前記と同じ方法で追試を行って確認をした。以上のようなスクリーニングの結果、葉状体形成活性を示す菌株として、YM-1-69株とYM-2-23株が単離された。YM-1-69株はサボテングサ (*Halimeda opuntia*) (緑藻ミル目) から単離された菌株であり、YM-2-23株はヒトエグサ (*Monostroma nitidum*) (緑藻アオサ目) から単離された菌株である。

【0019】

〔参考例2〕微生物の同定

参考例1で得られた微生物の16S rRNA V3領域及びgyrB遺伝子のDNA塩基配列を決定した。YM-1-69株の16S rRNA V3領域及びgyrB遺伝子のDNA塩基配列をそれぞれ配列番号1及び配列番号3に示す。また、YM-2-23株の16S rRNA V3領域及びgyrB遺伝子のDNA塩基配列をそれぞれ配列番号2及び配列番号4に示す。得られた配列についてデータベース検索 (DDBJ-fasta) を行った結果、各配列は表1に示す微生物の配列と高い相同性を示した。

【0020】

【表 1】

配列	相同性 (%)	近縁配列を持つ生物	Accession Number
1	94.18	<i>Zobellia uliginosa</i>	M62799
2	95.26	<i>Tenacibaculum amylolyticum</i>	AB032505
3	78.18	<i>Zobellia uliginosa</i>	AB034224
4	84.91	<i>Tenacibaculum amylolyticum</i>	AB032586

【0021】

また、YM-1-69株及びYM-2-23株の生理生化学的性質について調査した結果を表 2 に示す。

【0022】

【表 2】

生理生化学的性質	YM-1-69	YM-2-23
グラム反応	—	—
カタラーゼ活性	+	+
オキシダーゼ活性	+	+
OF 試験	O	F
マグネシウムあるいはカルシウムの要求	+	+
硝酸塩の還元	+	+
インドール産生	—	—
ゼラチン加水分解	—	—
デンプン加水分解	+	+
DNA 加水分解	+	+
Tween80 加水分解	+	+
エスクリン加水分解	+	+
アルギニンジヒドロラーゼ活性	—	—
ウレアーゼ活性	—	—
β -ガラクトシダーゼ活性	—	+
クエン酸の利用	—	—
シモンズ培地	—	—
クリステンセン培地	—	—

+: 陽性、—: 陰性

【0023】

表 1 及び表 2 の結果から、YM-1-69株はテナシバキュラム・スピーシーズ (*Tenacibaculum* sp.) と同定され、YM-2-23株はフラボバクテリウム・スピーシーズ (*Flavobacterium* sp.) と同定された。*Tenacibaculum* sp. YM-1-69株及び*Flavob*

acterium sp. YM-2-23株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにそれぞれ受託番号FERM P-18479（寄託日：平成13年8月30日）及びFERM P-18478（寄託日：平成13年8月20日）として寄託されている。

【0024】

〔実施例1〕 マキヒトエ培養実験

抗生物質等での無菌化処理したマキヒトエ (Monostroma oxyspermum) はASP7培地などの合成培地中では天然に見られるような葉状形態を失い、ほぼ単細胞状態となる。

48孔浮遊培養用マイクロプレート（IWAKI社製、以下48-MTPと略す）の一行目に改変ASP7培地を1ml、二行目以降に0.9mlを添加し、一行目に試験対象となる活性物質分画フラクションを11 μ lずつ添加し、ピペッティングによりよく攪拌しながら次の列に100 μ lを添加した。この操作を各フラクションに対して8～18回繰り返すことにより、10倍ずつの希釈系列を8～18段階作成することができる。最後の列に余る100 μ lは破棄した。ここに、最終的に細胞濃度が1mlあたり10～20細胞となるように希釈したマキヒトエ培養液を48-MTPのすべての孔に100 μ lずつ添加して総量を1mlとした。この48-MTPを明期のみの条件で22℃、3～5日間培養し、倒立顕微鏡下で葉状体形成の判定を行った。葉状体形成が見られた最も低いサンプル濃度を最少有効濃度（MEC）と定義し、MECの最も低いサンプルに活性物質が集中していると考え、分離の指標とした。

【0025】

サンプルを添加しない場合の培養5日後のマキヒトエ培養細胞の写真を図5に示す。また、サンプルを添加した場合の培養5日後のマキヒトエ培養細胞の写真を図6に示す。活性物質が存在した場合は図6のように葉状体の形成が見られた。

なお、ASP7培地の組成は以下の通りである。

【0026】

【表 3】

改変ASP7培地 (1 L 分、pH 7.8~8.0)

蒸留水	950 ml
NaCl	25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	9 g
KCl	700 mg
CaCl ₂	840 mg
Tris·HCl	1 g
NaNO ₃	50 mg
Na ₂ -glyceroP0 ₄	20 mg
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	70 mg
Vitamin B12	1 μg
ニトリロ三酢酸	70 mg
Vitamin Mix S3 *1	10 ml
PII metals *2	30 ml
S2 metals *3	5 ml

【0027】

【表 4】

*1 Vitamin Mix S3

蒸留水	100 ml
塩酸チアミン	5 mg
ニコチン酸	1 mg
パントテン酸カルシウム	1 mg
p-アミノ安息香酸	0.1 mg
ビオチン	0.01 mg
イノシトール	50 mg
チミン	30 mg
葉酸	0.02 mg

【0028】

【表 5】

*2 PII metals

蒸留水	1000 ml
Na ₂ -EDTA	1 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	48 mg
H ₃ BO ₃	1.13 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	144 mg
ZnCl ₂	5.2 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4 mg

【0029】

【表 6】

*3 S2 metals

蒸留水	500 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	63 mg
NaBr	640 mg
SrCl ₂ ·6H ₂ O	304 mg
RbCl	14 mg
LiCl	61 mg
KI	0.65 mg
V ₂ O ₅	0.18 mg

【0030】

【実施例 2】新規化学物質 1 の分離・精製

種菌としてフラボバクテリウム・スピーシーズYM-2-23 (FERM P-18478) を用いた。本培養培地は、マリンプロス（ディフコ社製、37.4g/l、又は表示成分に従って各試薬を混合して調製）を用いた。該菌株を100ml三角フラスコ中で50mlのマリンプロスを用いて30℃で24時間振盪（毎分100回転）培養し、これを更に培地450mlのバッフル付1リットル容三角フラスコに全量を植菌し、同様の条件で24時間培養した。本培養は、培地が800ml入ったバッフル付1リットル容三角フラスコ16本で振盪培養（毎分130回転）及び培地が450ml入った1リットル容三角フラスコ10本で振盪培養（毎分100回転）で行い、培養温度30℃、培養時間は3日間とした。このようにして得られた培養液約18リットルを遠心分離した。菌体は抽出するまで-20℃に、培養濾液は4℃で保管した。前記本培養4回分（約72リット

ル分)の菌体を50%アセトニトリル水溶液1200mlで二回抽出し、濃縮した。濃縮液を培養濾液約72リットルとあわせ、スチレンジビニルベンゼンポリマーであるダイヤイオンHP-20(三菱化学株式会社)2500mlに吸着させた。樹脂を10%アセトニトリル水溶液6000mlで洗浄して脱塩し、50%アセトニトリル水溶液6000mlで溶出して葉状体形成誘因画分を得た。活性画分をTOYOPEARL DEAE-650(M)(東ソー株式会社)に吸着させ、180mM NaCl-20%アセトニトリルで洗浄した後、450mM NaCl-20%アセトニトリル水溶液で活性画分を溶出した。溶出画分を減圧濃縮してアセトニトリルを除いた後、ダイヤイオンHP-20(三菱化学株式会社)500mlに吸着させ、10%アセトニトリル水溶液1000mlで洗浄して脱塩し、50%アセトニトリル水溶液1000mlで活性画分を得た。減圧濃縮した後、凍結乾燥を行い葉状体形成誘因画分を得た。前記培養と粗画分の調製二回分(培養液約140リットル分)をあわせて、移動相として100mM NaCl-20mM Na_2HPO_4 -20%アセトニトリル水溶液(pH 9)を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(アマシャムバイオサイエンス株式会社製Sephacryl S-100 HR内径25mm×長さ1200mm)で精製し、葉状体誘因活性を示す画分を得た。この活性画分を濃縮、脱塩後、凍結乾燥し、移動相として14~22%アセトニトリル-5g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /l水溶液を用いた高速液体クロマトグラフィー(アマシャムバイオサイエンス株式会社製RESOURCE RPC 3 ML、内径6.4mm×長さ100mm×2本直列)で分離し、活性画分を凍結乾燥後、更に移動相として5~25%アセトニトリル-1% NH_3 水溶液を用いた高速液体クロマトグラフィー(アマシャムバイオサイエンス株式会社製RESOURCE RPC 3 ML、内径6.4mm×長さ100mm×2本直列)にて精製したところ、前記の理化学的性質を有する本発明の新規化学物質1を約140 μg 得た。

【0031】

[実施例3] 新規化学物質2の分離・精製

実施例2に従って分離される新規化学物質1は最終精製における5~25%アセトニトリル-1% NH_3 水溶液という強アルカリ条件で新規化学物質2が変化したものであることが明らかになっている。また、新規化学物質1は精製前の培養液上清に新規化学物質2とともに存在する。新規化学物質2は中性-弱酸性で極めて不安定であるがアルカリ条件で誘導される新規化学物質1は比較的安定である。

実施例 2 における最終精製の段階で、移動相として 17% アセトニトリル-5g (NH_4) $_2\text{CO}_3$ +5ml NH_3 /l 水溶液を用いた高速液体クロマトグラフィー (アマシャムバイオサイエンス株式会社製 RESOURCE RPC 3 ML、内径 6.4mm×長さ 100mm×2 本直列) により分離を行うと図 4 のような ^1H -NMR スペクトルを示す化学物質 2 を得ることができる。

【0032】

[実施例 4] 新規化学物質 1 のメチル化体及びその誘導体の調製と理化学的性質
新規化学物質 1 約 140 μg をメタノール 40 μl に溶かし、ベンゼン 160 μl 、トリメチルシリルジアゾメタン (10%、n-ヘキサン溶液、東京化成工業株式会社製) 100 μl を添加してよく攪拌し室温で 2 時間反応させた。ジアゾメタンの黄色が消えるまで少量ずつ酢酸を添加し、エバポレーターで溶媒を留去した後、移動相として 50~100% アセトニトリル-水を用いた高速液体クロマトグラフィー (東ソー株式会社製 TSKgel ODS-80Ts、内径 4.6mm×長さ 150mm) にて分離したところほぼ定量的 (収量約 152 μg 、収率 99%) に新規化学物質 1 のトリメチル体 (以下 Me 1 と略す) を得た。また、このトリメチル体は NMR 測定溶媒である重メタノール中でメトキシ基 ($-\text{OCH}_3$) の一つが徐々に重メトキシ基 ($-\text{OCD}_3$) と置換し Me 1 B を与える。Me 1 約 152 μg をメタノール 200 μl に溶かし氷冷下水素化ホウ素ナトリウム 1mg を添加し 1 時間還元させた。反応液を、移動相として 50~100% アセトニトリル-水を用いた高速液体クロマトグラフィー (東ソー株式会社製 TSKgel ODS-80Ts、内径 4.6mm×長さ 150mm) にて分離したところ高収量で (収量約 140 μg 、収率 98%) Me 1 の還元体 (以下 Me 1 H 3 と略す) を得た。ここで得た化合物は、以下に示した理化学的性質を示した。

【0033】

[Me 1 の理化学的性質]

1. 物質の色: 無色

2. 分子量: 499

3. 分子式: $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

質量分析: FABMS: m/z 500 $[\text{M}+\text{H}]^+$

高分解能質量分析: 実測値 500.2569 $[\text{M}+\text{H}]^+$

計算値 500.2583 ($C_{27}H_{38}N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1) 1H -NMR (重メタノール、500 MHz)：(図 7)

δ ppm 0.916 (3H, s), 0.941 (3H, s), 0.973 (3H, s), 1.086 (1H, ddd, $J = 3.5, 12.5, 13.0$ Hz), 1.136 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz), 1.271 (1H, ddd, $J = 4.0, 13.0, 14.0$ Hz), 1.380 (3H, s), 1.47 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.69 (2H, m), 1.73 (1H, m), 1.84 (1H, m), 2.130 (1H, ddd, $J = 3.5, 7.0, 12.5$ Hz), 2.34 (2H, m), 3.488 (3H, s), 3.914 (3H, s), 4.034 (3H, s), 7.911 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.258 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

2) ^{13}C -NMR (重メタノール、125 MHz)：(図 8)

δ ppm 15.413 (q), 19.559 (t), 20.797 (t), 20.961 (q), 21.981 (q), 28.416 (t), 33.835 (q), 34.164 (s), 37.928 (s), 40.356 (t), 41.722 (t), 42.996 (t), 52.266 (q), 53.255 (q), 52.255 (q), 53.328 (d), 57.432 (d), 79.291 (s), 120.0 (s), 127.392 (d), 140.407 (d), 141.6 (s), 146.659 (s), 149.8 (s), 164.761 (s), 166.027 (s), 167.4 (s)

5. 溶解性：水及びDMSOに難溶、50～100%メタノール水溶液、50～100%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に難溶。

【 0 0 3 4 】

[Me 1 Bの理化学的性質]

1. 物質の色：無色

2. 分子量：502

3. 分子式： $C_{27}H_{34}D_3N_3O_4S$

質量分析：FABMS： m/z 503 $[M+H]^+$

高分解能質量分析：実測値 503.2777 $[M+H]^+$

計算値 503.2772 ($C_{27}H_{35}D_3N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (重メタノール、500 MHz)：(図 9)

δ ppm 0.916 (3H, s), 0.941 (3H, s), 0.973 (3H, s), 1.086 (1H, ddd, $J = 3$

.5, 12.5, 13.0 Hz), 1.136 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz), 1.271 (1H, ddd, $J = 4.0, 13.0, 14.0$ Hz), 1.380 (3H, s), 1.47 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.69 (2H, m), 1.73 (1H, m), 1.84 (1H, m), 2.130 (1H, ddd, $J = 3.5, 7.0, 12.5$ Hz), 2.34 (2H, m), 3.488 (3H, s), 3.914 (3H, s), 7.911 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.258 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

5. 溶解性：水及びDMSOに難溶、50～100%メタノール水溶液、50～100%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に難溶。

【 0 0 3 5 】

[Me 1 H 3 の理化学的性質]

1. 物質の色：無色

2. 分子量：471

3. 分子式： $C_{26}H_{37}N_3O_3S$

質量分析：FABMS： m/z 472 $[M+H]^+$

高分解能質量分析：実測値 472.2630 $[M+H]^+$

計算値 472.2634 ($C_{26}H_{38}N_3O_3S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) : (図10)

δ ppm 0.802 (3H, s), 0.810 (3H, s), 0.885 (3H, s), 0.951 (1H, m), 1.018 (1H, m), 1.150 (1H, m), 1.254 (3H, s), 1.35 (1H, m), 1.36 (1H, m) 1.37 (1H, m), 1.50 (1H, m), 1.54 (1H, m), 1.57 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.688 (1H, m), 1.984 (1H, m), 2.174 (2H, br d, $J = 8.5$ Hz), 3.399 (3H, s), 3.741 (3H, s), 4.570 (2H, br d, $J = 5.5$ Hz), 5.495 (1H, br t, $J = 5.5$ Hz), 7.587 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.722 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

2) ^{13}C -NMR (重メタノール、HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) 及びHSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) スペクトルをもとにケミカルシフトを算定) :

δ ppm 14.2 (q), 17.7 (t), 19.0 (t), 20.0 (q), 21.1 (q), 26.7 (t), 33.0 (q), 33.3 (s), 36.1 (s), 38.3 (t), 40.1 (t), 41.1 (t), 51.2 (q), 51.2 (d)

, 52.0 (q), 55.2 (d), 63.7 (t), 76.8 (s), 119.2 (s), 121.8 (d), 134.1 (s), 138.3 (d), 146.2 (s), 159.8 (s), 162.8 (s), 166.2 (s)

5. 溶解性：水及び100%メタノールに難溶、50%メタノール水溶液、50%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、DMSOに可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に難溶。

【 0 0 3 6 】

[実施例 5] 新規化学物質 1 の最少有効濃度 (MEC) の検討

実施例 1 の場合と同様に48-MTPに単離精製した新規化学物質 1 を終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ からはじめ、16段階希釈を行った。このとき、マキヒトエの細胞は培地 1ml あたり約20細胞とした。希釈の際は一段階希釈するごとにピペットチップを交換した。このシリーズを3列用意し、実施例 1 と同様に3日間培養した。その結果、12段階希釈の列までマキヒトエの葉状体形成が見られた。このことから新規化学物質 1 のMECは、

$$1\mu\text{g}/\text{ml} \times 10^{-12} = 1\text{ ag}/\text{ml} \text{ (atto-gram per milliliter)}$$

となる。長期の培養に伴い、新規化学物質 1 は増殖したマキヒトエに消費され、葉状体が崩壊し始める。培養10日後の7段階希釈（新規化学物質 1 終濃度 $1 \times 10^{-7}\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の写真を図11に示す。葉状体の原型がやや残っているが葉状体崩壊が観察される。培養10日後の6段階希釈（新規化学物質 1 終濃度 $1 \times 10^{-6}\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の写真を図12に示す。葉状体が崩壊せずに維持されており、培養10日後のMECは、

$$1 \times 10^{-6}\mu\text{g}/\text{ml} = 1\text{ pg}/\text{ml} \text{ (pico-gram per milliliter)}$$

となる。マキヒトエの細胞は実施例 1 の条件では一日に約2回細胞分裂を行うことから初期細胞数が20の場合、3日後には計算上、

$$20 \times (2 \times 2)^3 = 1,280 \text{細胞}$$

であるが、10日間の培養では計算上、

$$20 \times (2 \times 2)^{10} = 20,971,520 \text{細胞}$$

となり、3日後と比べると10日後には細胞数が10,000倍以上に増殖しており、MECが細胞数と培養日数によって大きく変化することが説明できる。つまり、新規化学物質 1 は培養日数と細胞の増殖に応じて適宜添加する必要がある。

【 0 0 3 7 】

【実施例 6】 アナアオサ、ボウアオノリの培養実験

静岡県清水市三保で採集したアナアオサ (*Ulva pertusa*)、ボウアオノリ (*Enteromorpha intestinalis*) から得られた遊走細胞を抗生物質混液添加ASP7培地で走光性を利用して洗浄後、滅菌したカバーガラスを敷き詰めた角形シャーレに添加して5日間の無菌化処理を行った。カバーガラスに遊走細胞が着低し発生が始まったところで各カバーガラスを6-MTPの各孔に入れ、抗生物質の入っていないASP7培地10mlを添加した。試験区には新規化学物質 1 を1ng/mlとなるように添加し、対象区には何も添加せずに実施例 1 と同じ条件で7日間培養した。10日後、試験区、対象区のカバーガラスを更に同じ条件の培地が添加してある培養試験管に植え継いで更に7日間培養した。アナアオサでの実験結果を図13に、ボウアオノリの実験結果を図14に示す。試験区、対象区を比較すると明らかなように、対象区の場合は仮根だけが異常に発達し、正常な葉状体の形成が見られないが、新規化学物質 1 を添加した場合は、着低後の正常な発生と葉状体の形成が見られた。

また、抗生物質混液添加ASP7培地は、ASP7培地に以下の組成を持つ抗生物質混液を2%添加したものである。

【0038】

【表 7】

抗生物質混液

蒸留水	1000 ml
ペニシリン	100 mg
ストレプトマイシン	200 mg
カナマイシン	100 mg

【0039】

【発明の効果】

本発明は、新規化学物質を使ったアオサ、ヒトエグサなどの海洋性大型緑藻類の新規な培養・養殖技術を提供する。この方法によれば、実験室内での無菌的な培養や種苗の安全な維持管理、更に、養殖現場等での海洋性大型緑藻類の安定な成長と生産を行うことが可能である。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.

<120> NOVEL CHEMICAL SUBSTANCE

<130> P02-0440

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 190

<212> DNA

<213> Tenacibaculum sp.

<400> 1

CCTACGGGAG GCAGCAGTGA GGAATATTGG TCAATGGAGG CAACTCTGAA CCAGCCATGC 60
CGCGTGTAGG AAGACTGCCC TATGGGTTGT AAATACTTT TATATGGGAA GAAACCCCTC 120
TTACGTGTAG AGGCTTGACG GTACCATAAG AATAAGCACC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG 180
CCGCGGTAAT 190

<210> 2

<211> 190

<212> DNA

<213> Flavobacterium sp.

<400> 2

CCTACGGGAG GCAGCAGTGA GGAATATTGG ACAATGGGCG GGAGCCTGAT CCAGCCATGC 60
CGCGTGCGGG AAGAAGGCCC TATGGGTCGT AAACCGCTTT TATACGGGAA GAAACCACCC 120
TACGTGTAGG GTACTGACGG TACCGTAAGA ATAAGGACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC 180
CGCGGTAAT 189

<210> 3

<211> 1173

<212> DNA

<213> *Tenacibaculum* sp.

<400> 3

GTATCTGGAG GTTTACACGG AGTTGGTGTA TCTTGTGTGA ATGCACTTTC AGATCATTTA 60
AAAGCTACAG TTCACAGAGA AGGTAAAATA TGGGAACAAG AGTATGAACG TGGTAAAACA 120
CTTTATCCTG TAAAACTGT AGGTGAACT GATATAACTG GTACAGAAGT AACTTTCTTA 180
CCAGACAAAA GTATTTTCCA ACAAACCACA GAATATAATT ACGAAACGTT AGCTACACGT 240
ATGCGTGAGT TAGCGTATCT TAATAAAGGA ATCACGATTA CGTTAACAGA TAAGCGTAAT 300
AAAGATGATG AAGGAAATTT TATTGCTGAA ACTTTCCACA GTAACGAAGG ATTATCTGAA 360
TTTGTTAAAT ATTTAGATAG TACTCGTACT CCTGTTATTC AGCATGTAAT TTCAATGGAA 420
GGTGAGAAAA ACGGAATTCC TGTTGAGGTT GCAATGATTT ATAATGATTC ATATGCTGAA 480
AATTTACATT CTTATGTAAA TAACATTAAT ACTCACGAAG GAGGAACACA TTTATCAGGA 540
TTTAGAAGAG GTTTAACAAG TACTTTAAAG AAATATGCAG ATACTTCTGG ATTACTAAAG 600
AACGTTAAGT TTGAGATTTT TGGAGATGAT TTCCGTGAAG GTTTAACGGC AATTGTATCT 660
GTAAAAGTAG CTGAACCTCA GTTTGAAGGA CAAACAAAAA CAAAATTAGG AAACAGAGAA 720
GTTACTTCTG CAGTATCGCA AGCTGTAGCA GAAATGTAA CTGATTATTT AGAGGAAAAT 780
CCTAATGATG CTA AACGAT TGTACAAAAA GTAATTCTTG CAGCTCAAGC GCGTCACGCA 840
GCTCGTAAAG CAAGAGAAAT GGTGCAACGT AAAACAGTAA TGAGTATTGG AGGTTTACCT 900
GGTAAACTAT CTGATTGTTC TGAAACTGAT CCAGCAGTTT GTGAAATTTT CTTAGTCGAG 960

GGAGATTCCG CAGGTGGAAC TGCAAAACAA GGTCGTGATC GTAATTTCCA AGCAATTTTA 1020
CCCTTACGTG GTAAGATTCT TAACGTAGAA AAAGCGATGC AGCATAAAGT TTTTGAGAAT 1080
GAAGAAATCA AAAACATGTT TACGGCTTTA GGAATCACTA TCGGAACAGA AGAAGATCCA 1140
AGAGCATTA ACTTATCAAA ATTAAGATAT CAT 1173

<210> 4

<211> 1173

<212> DNA

<213> *Flavobacterium* sp.

<400> 4

GTATCCGGTG GTTTGCACGG GGTAGGTGTT TCTTGTGTGA ACGCCCTTTC CAATCATCTT 60
AAAGCTACCG TACATAGAGA TGGGAAAGTT TGGGAACAGG AATATGAACG GGGTAAATCC 120
CTTTATCCCG TAAAAAGTGT TGGGGAGACC GATGAAACTG GAACCATTGT TACCTTCATA 180
CCAGATGATT CAATCTTTAC CCAAACAACA GAGTATAGTT ATGAGACCCT TGCCAACAGA 240
ATGCGTGAGC TTTCGTTCTT GAACAAAGGG GTTACCATTA GCATTACGGA CAAAAGAGTA 300
AAGGATAAAG AAGGGGAGTA CCTTTCTGAA ACTTTTATT CCGATGCTGG ACTAAGTGAA 360
TTTGTTAAGT TCTTGGATGG TACCCGTGAA CCTTTGATTC AAGGGGTAT CGCGATGGAA 420
GGGGAGAAAA ATGGTATCCC TGTGGAAGTG GCAATGGTTT ACAACACCAG TTACACGGAG 480
AATTTACATT CCTATGTGAA TAACATTAAC ACGCACGAAG GGGGTACGCA TCTTTCCGGT 540
TTTAGAAGGG GATTGACCTC TACTTTAAAG AAATACGCAG ATTCTTCTGG AATGCTCGAG 600
AAATTGAAAG TTGAGGTTCA GGGAGATGAT TTCCGTGAAG GACTTACAGC AATTGTTTCC 660
GTTAAGGTCG CAGAACCTCA ATTTGAAGGT CAGACGAAAA CCAAGCTTGG AAACCGCGAG 720
GTTTCTTCTG CGGTGAGCCA AGCTGTTTCT GAAATGCTCA CGGATTATTT GGAGGAGCAT 780
CCAGATGATG CCAAGGTTAT TGTTCAAAAA GTTATCCTTG CCGCTCAGGC CAGACATGCC 840
GCTACAAAGG CCCGTGAAAT GGTACAGCGT AAGACGGTAA TGAGTATTGG TGGGCTACCT 900
GGAAAATTGT CCGATTGTTT TGAGCAAGAT CCTGCGCAAT GTGAAGTATT TCTTGTAGAG 960
GGAGATTCTG CAGGTGGTAC GGCAAAAATG GGCCGGGACC GAAAATTTC GGCATTCTT 1020
CCACTAAGGG GTAAAATCTT GAACGTGGAA AAAGCCATGC AGCACAAGGT TTTTGAAAAT 1080

GAGGAAATAA AGAATATTTA TACGGCCCTA GGGGTTACTA TTGGAACGGA AGAAGATAGT 1140
AAGGCCTTGA ACCTGGAAAA ATTAAGATAT CAT 1173

【図面の簡単な説明】

【図 1】

新規化学物質 1 の質量スペクトルを示す図である。

【図 2】

新規化学物質 1 の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図 3】

新規化学物質 1 の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図 4】

新規化学物質 2 の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図 5】

実施例 1 のマキヒトエ培養実験におけるサンプルを添加しない場合の培養5日後のマキヒトエ培養細胞の写真である。

【図 6】

実施例 1 のマキヒトエ培養実験におけるサンプルを添加した場合の培養5日後のマキヒトエ培養細胞の写真である。

【図 7】

Me 1 の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図 8】

Me 1 の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図 9】

Me 1 B の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図 1 0】

Me 1 H 3 の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図 1 1】

実施例 5 の培養10日後の7段階希釈の写真である。

【図 1 2】

実施例 5 の培養10日後の6段階希釈の写真である。

【図 1 3】

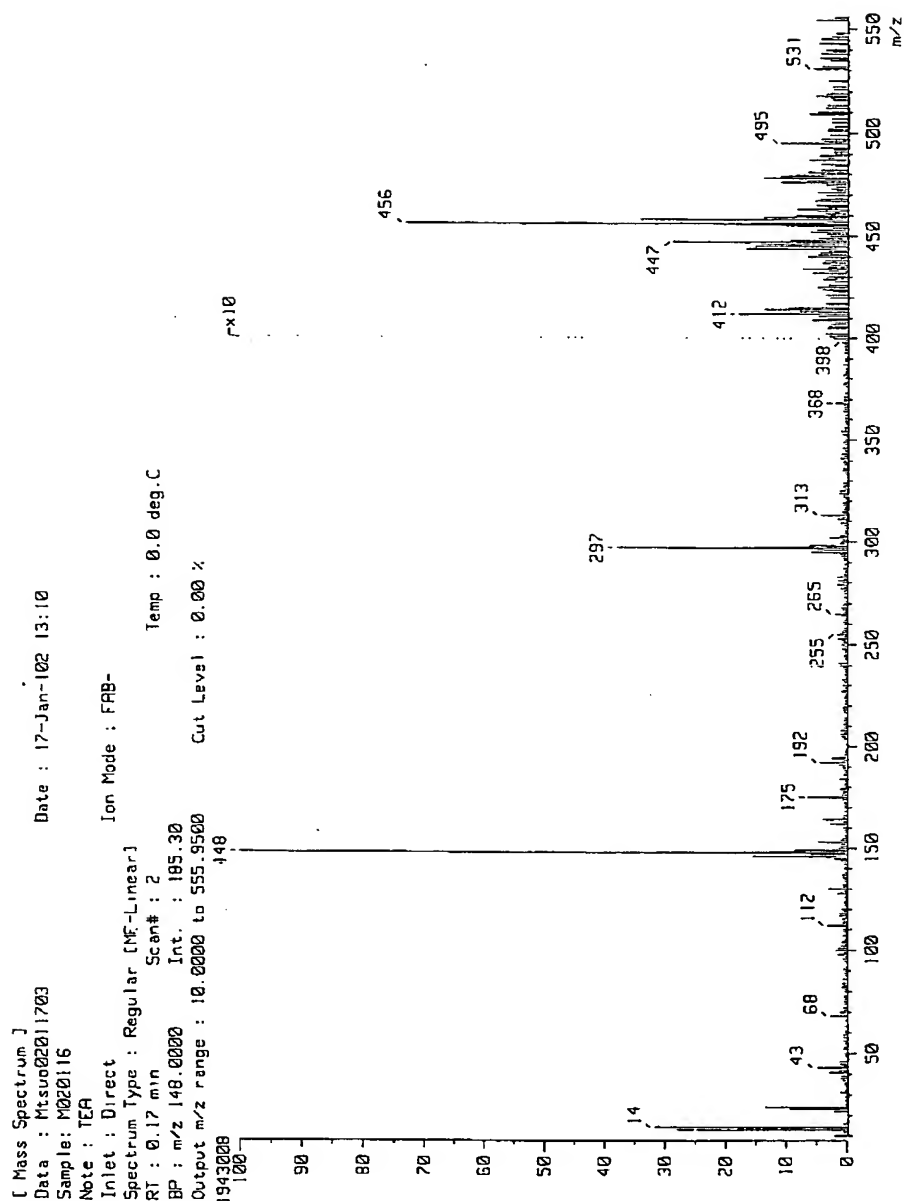
実施例 6 におけるアナアオサでの実験結果を示す写真である。

【図 1 4】

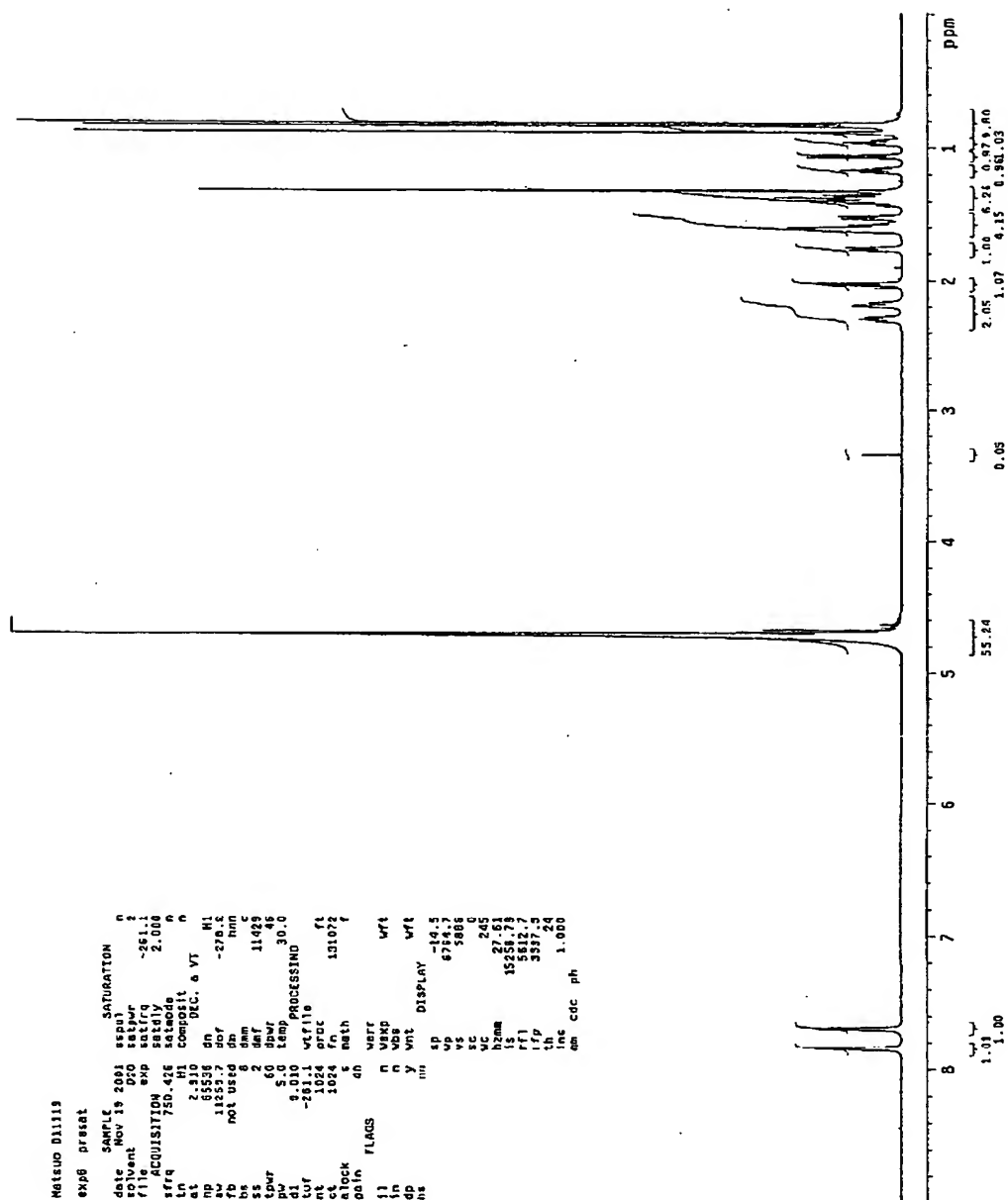
実施例 6 におけるボウアオノリでの実験結果を示す写真である。

【書類名】 図面

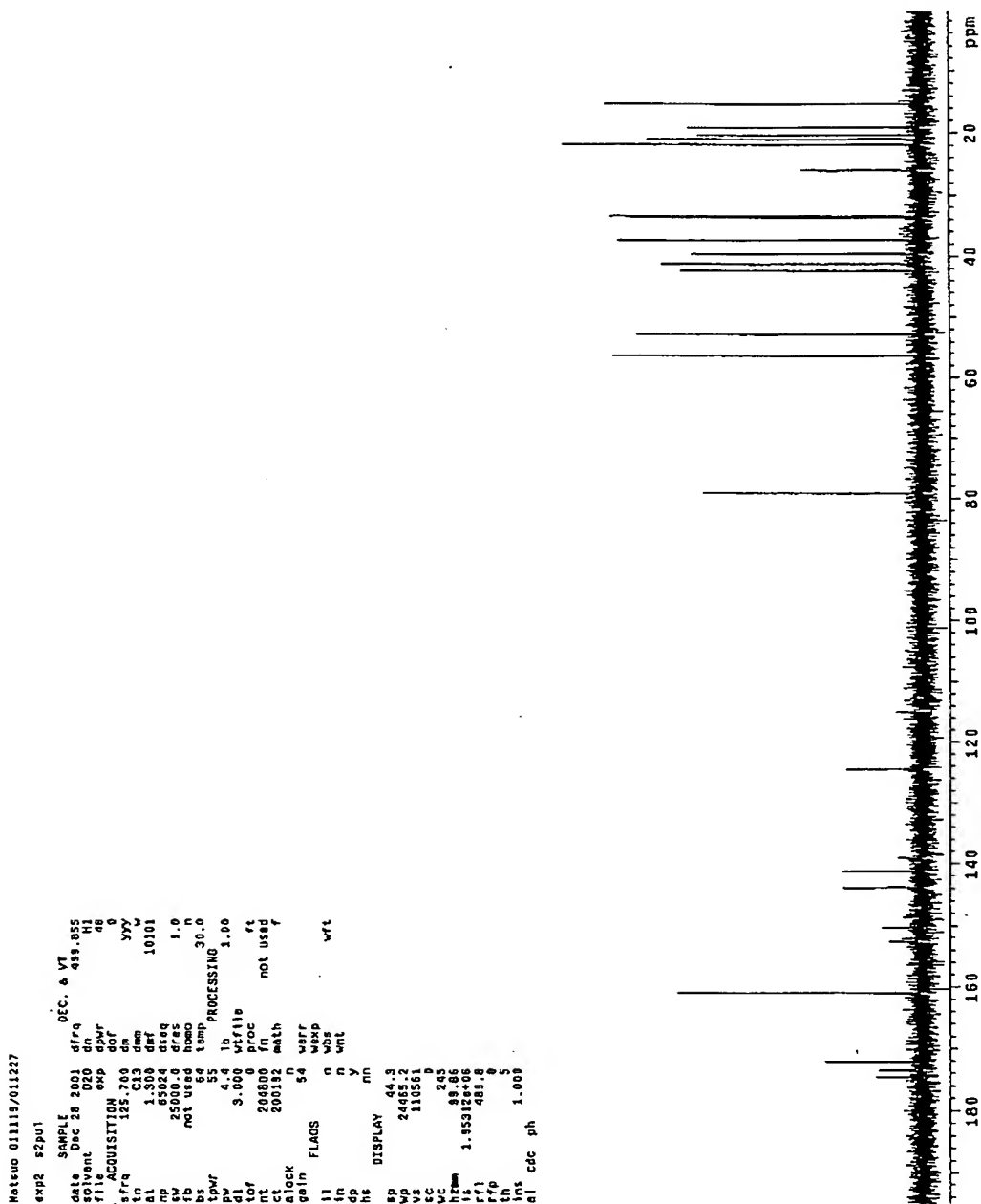
【図 1】



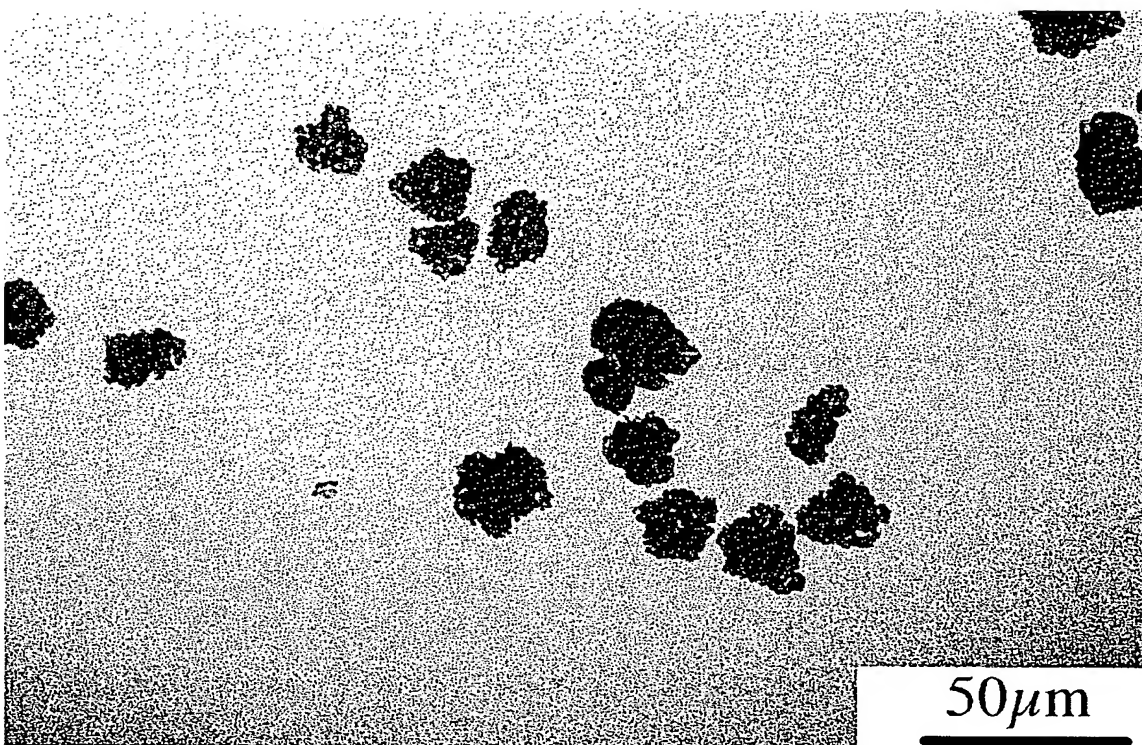
【図 2】



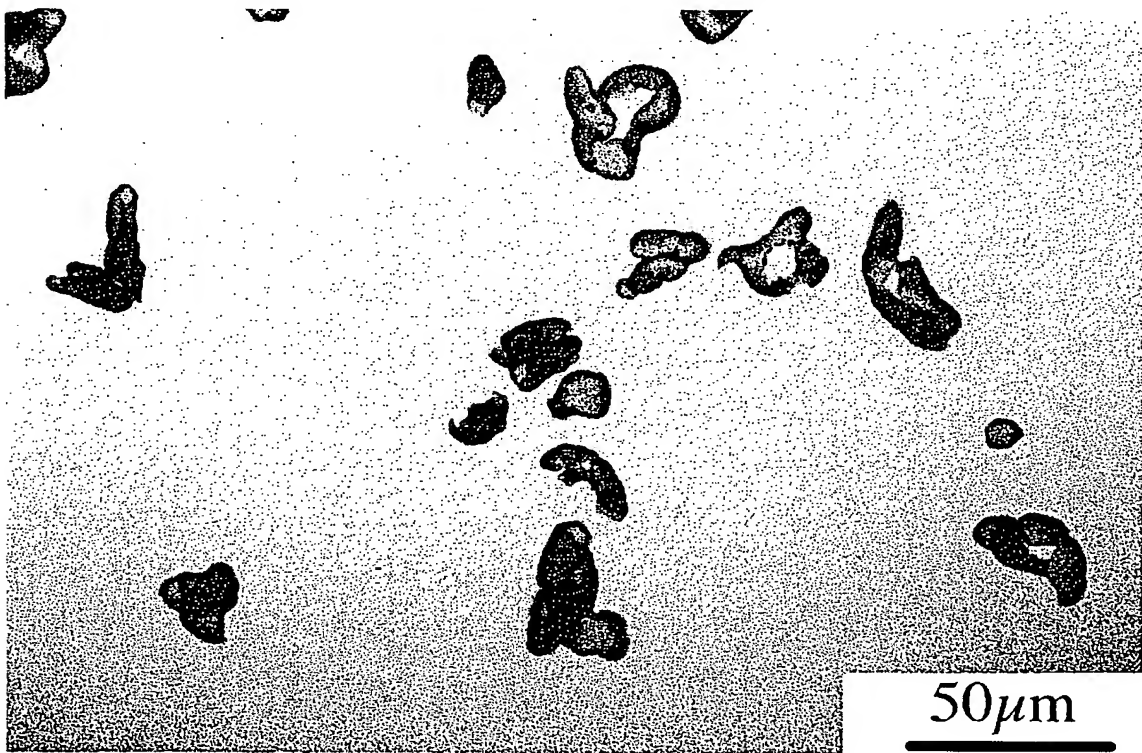
【図 3】



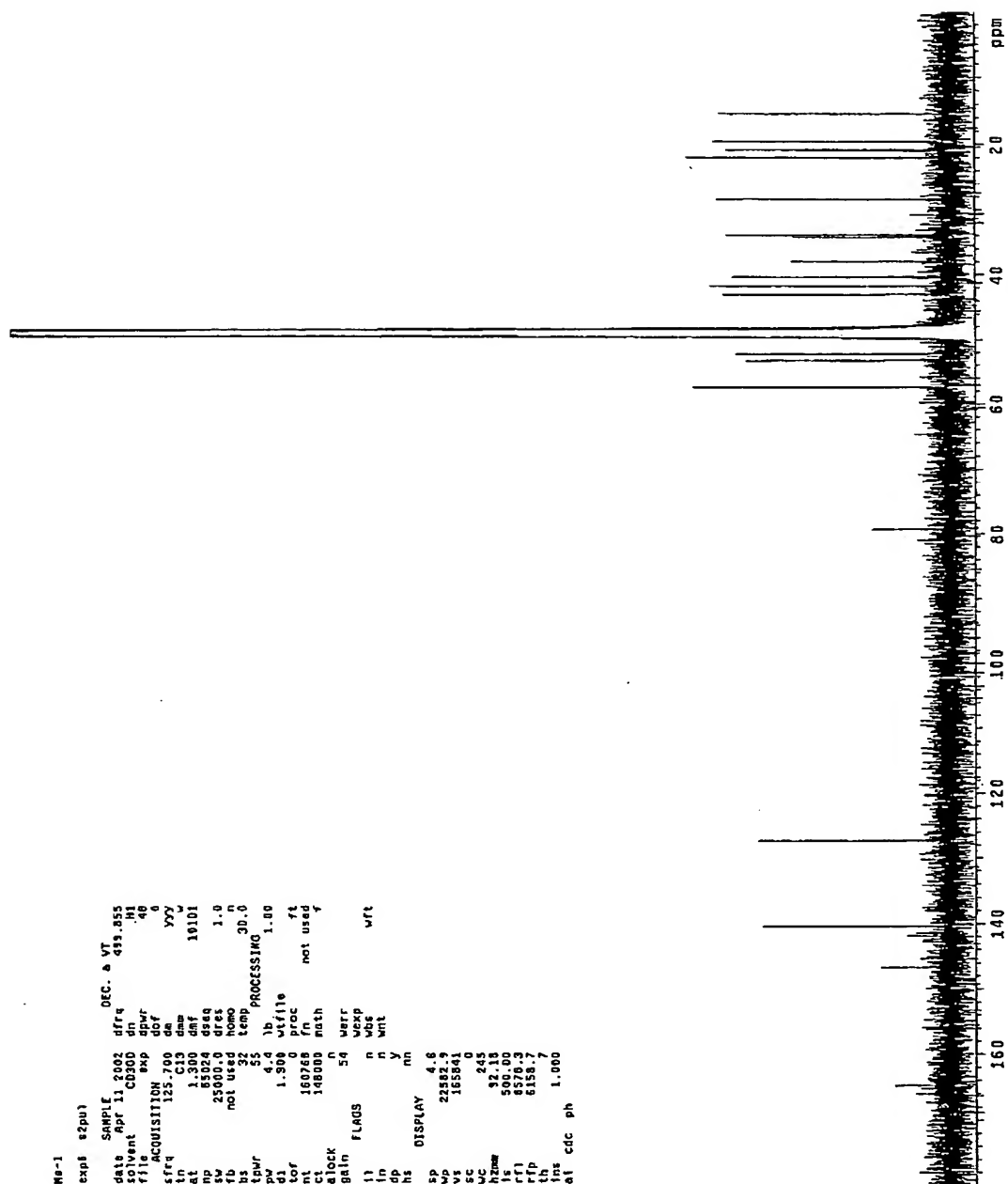
【図 5】



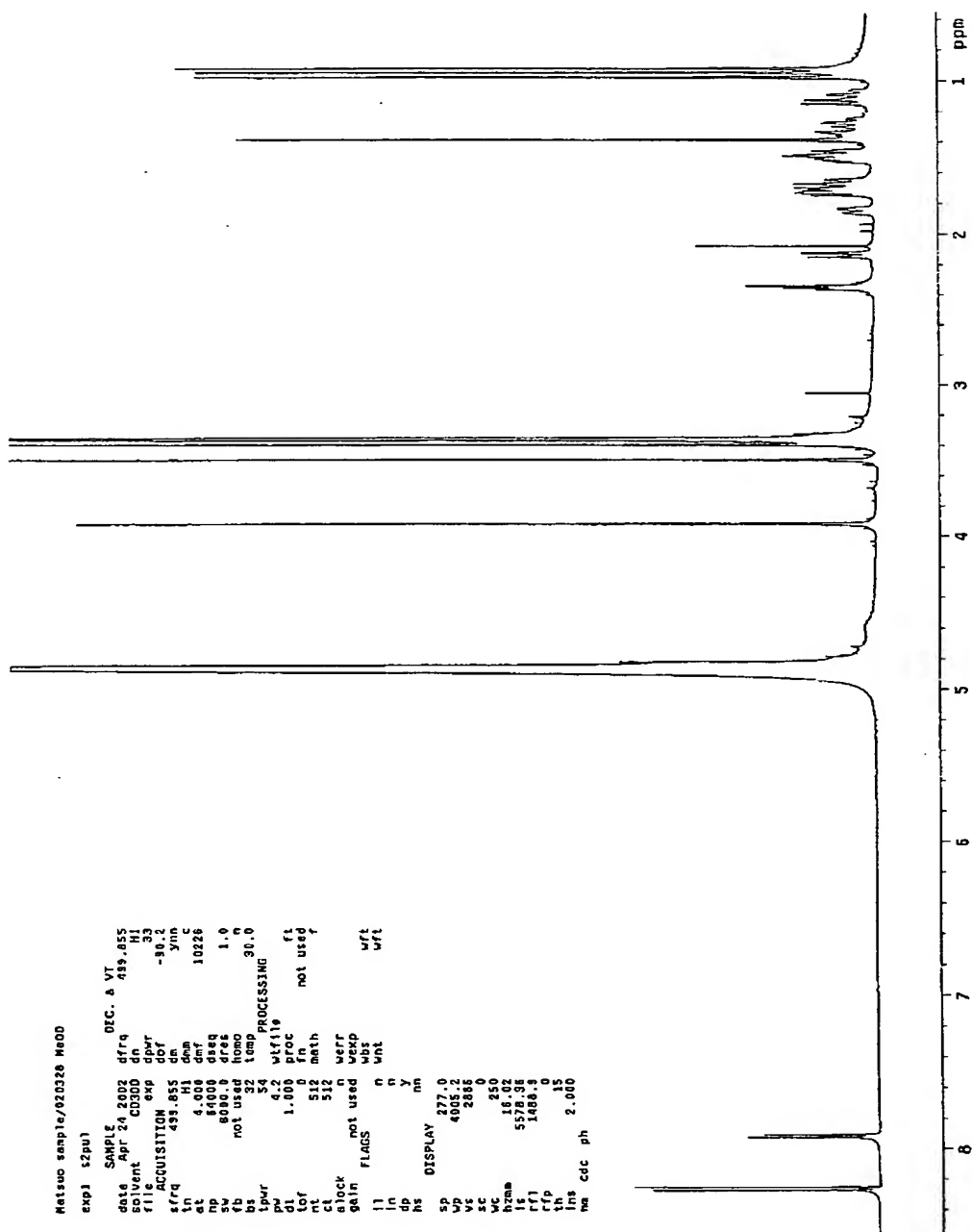
【図 6】



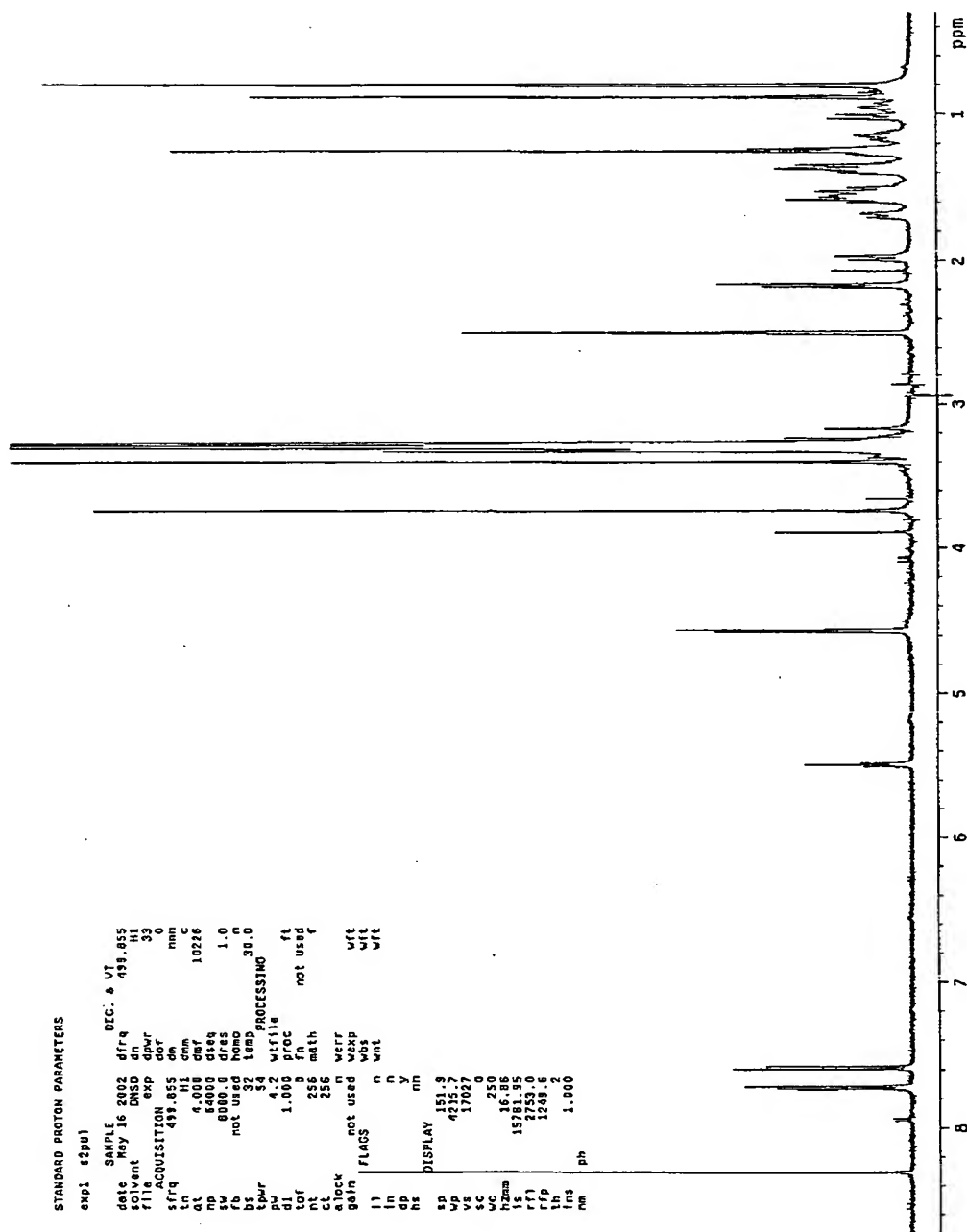
【図 8】



【図 9】



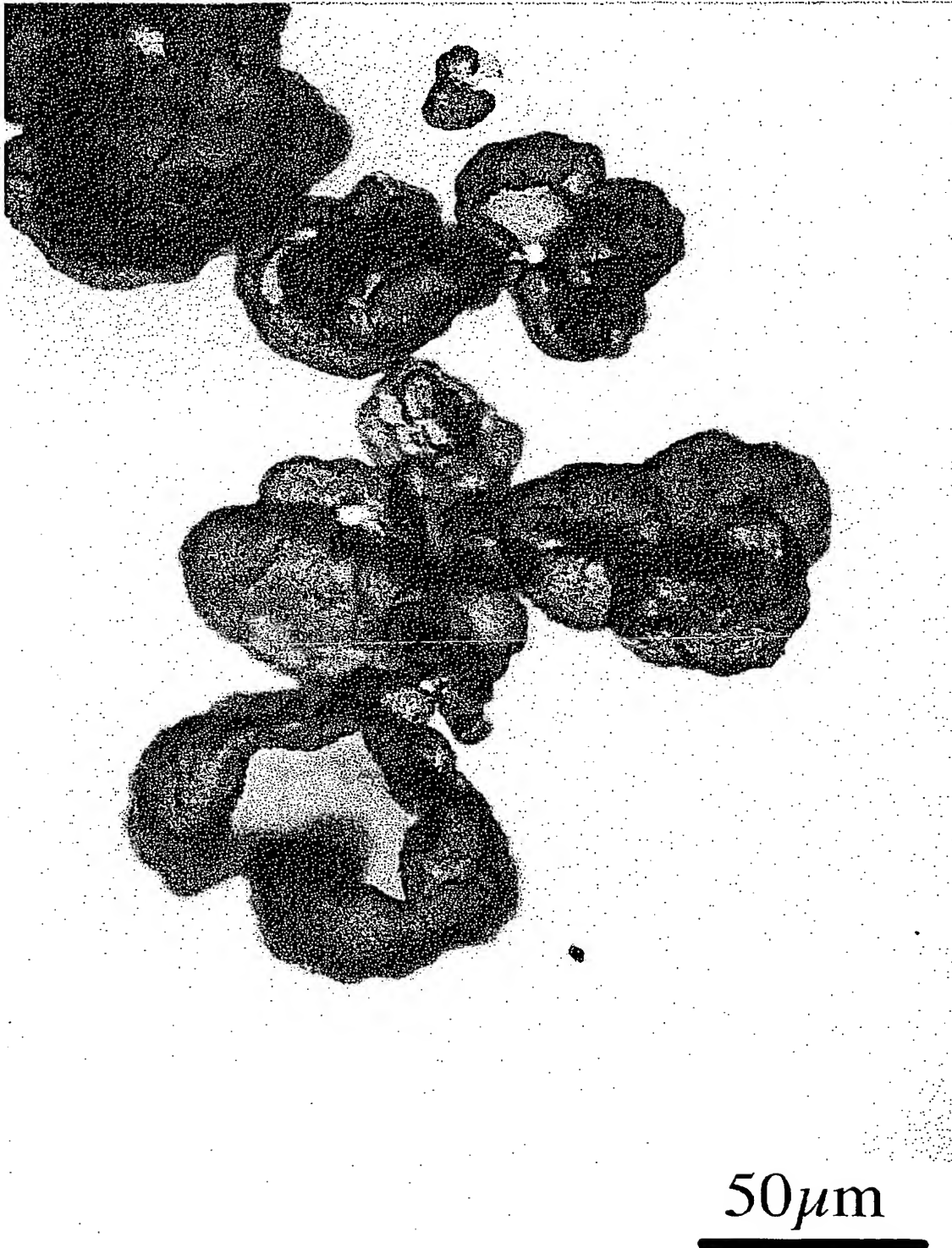
【図10】



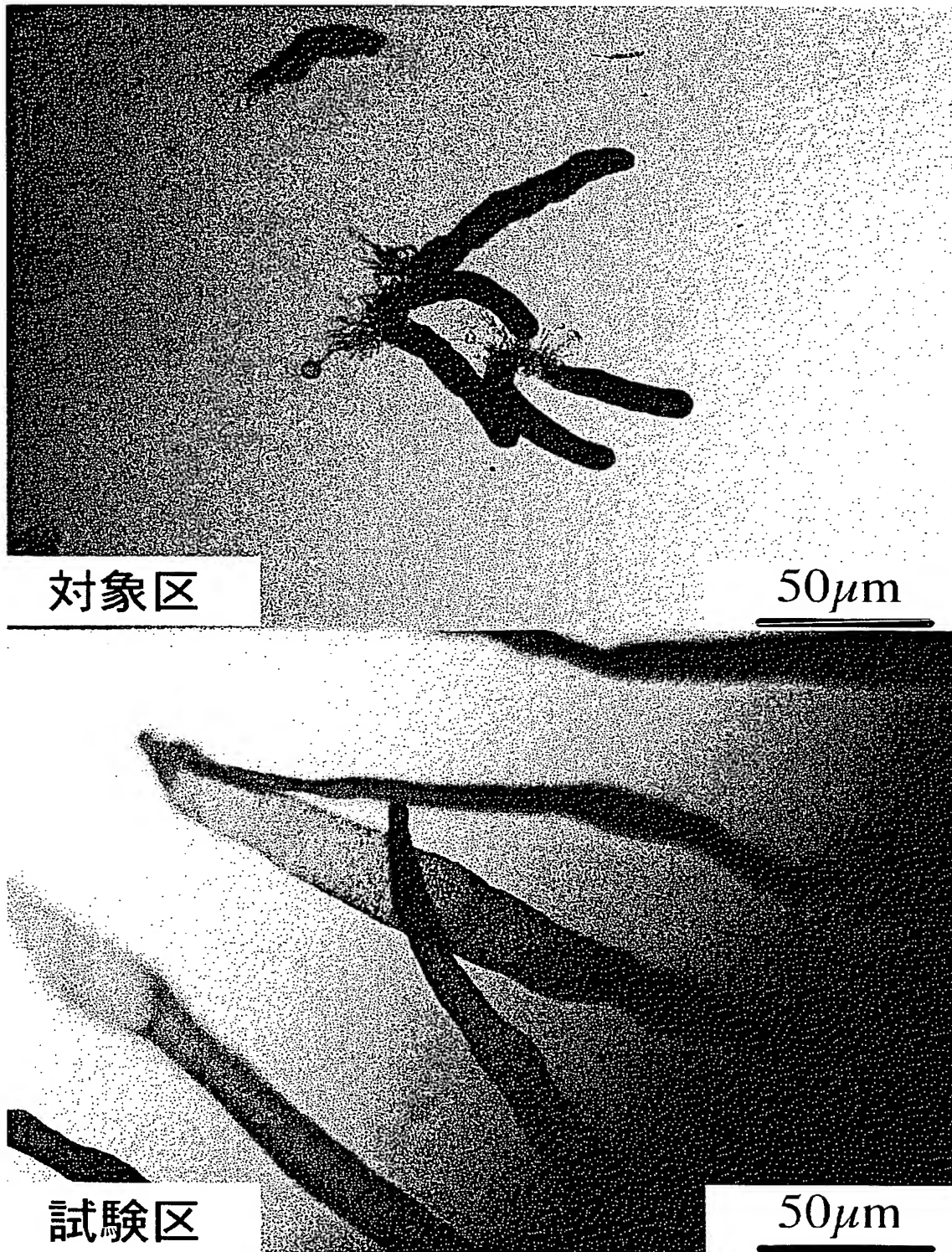
【図 11】



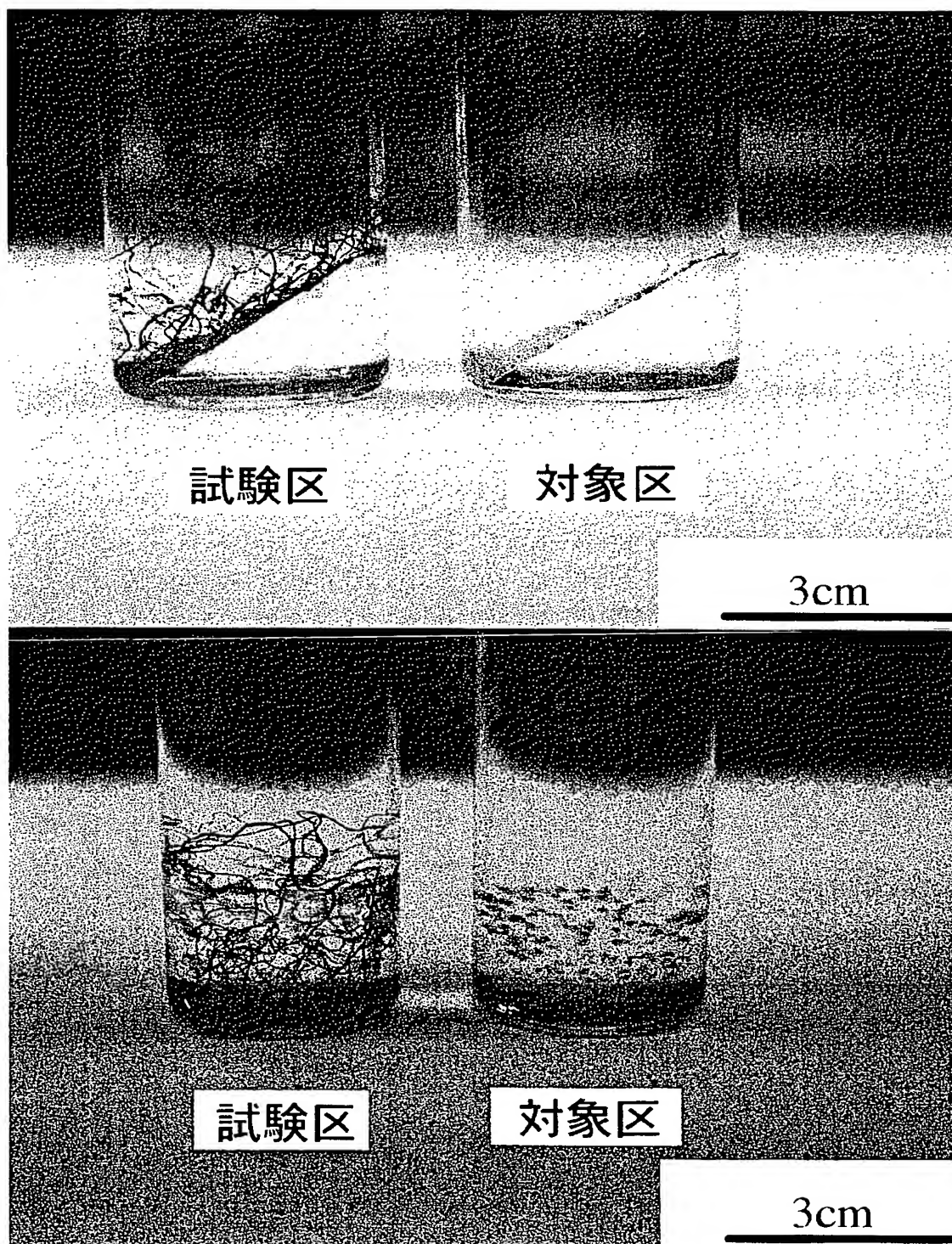
【図 12】



【図 13】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規化学物質を使ったアオサ、ヒトエグサなどの海洋性大型緑藻類の新規な培養・養殖技術を提供する。

【解決手段】 海洋性大型緑藻類の形態形成、成長促進を誘引する新規化学物質、微生物を用いて前記新規化学物質を製造する方法、及び前記新規化学物質を含有する藻類培養用合成培地。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 0 3 6 0 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 1 0 0 1 9 4 9]

1. 変更年月日 1 9 9 5 年 6 月 7 日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都文京区本郷 1 丁目 2 8 番 1 0 号
氏 名 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 4 月 2 3 日
[変更理由] 住所変更
住 所 岩手県釜石市平田第 3 地割 7 5 番 1 号
氏 名 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所